

**Deteksi *nervous necrosis virus* (NNV) - Bagian 1:
Metode *reverse transcription nested polymerase
chain reaction* (PCR)**





© BSN 2015

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Prinsip umum.....	2
4 Peralatan	2
5 Bahan	2
6 Prosedur	3
7 Pengamatan hasil dan dokumentasi.....	6
8 Intepretasihasil.....	6
9 Jaminanmutu	6
10 Keamanan dan keselamatan kerja	7
Lampiran A (informatif) Pembuatan larutan.....	8
Lampiran B (informatif) Pilihan komposisi bahan koktail untuk tahapan amplifikasi.....	9
Lampiran C (informatif) Interpretasi hasil untuk transkripsi balik dan amplifikasi tahap pertama.....	10
Bibliografi	11

Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan budidaya serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian di laboratorium acuan dan uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang deteksi *nervous necrosis virus* (NNV) - Bagian 1: Metode *reverse transcription nested polymerase chain reaction* (PCR).

Standar ini merupakan revisi dari SNI 7546:2009 dengan memperhatikan keterbaruan perkembangan teknologi dalam identifikasi dan deteksi NNV, dengan perubahan pada prinsip umum, peralatan dan bahan, serta prosedur. Standar ini merupakan salah satu bagian dari standar seri untuk deteksi NNV, pemisahan bagian didasarkan pada teknologi yang digunakan di laboratorium uji.

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis (PT) 65-07 Perikanan Budidaya dan dibahas dalam rapat konsensus RSNI bidang Kesehatan Ikan dan Lingkungan pada tanggal 22-23 Juni 2014 di Bogor yang dihadiri oleh anggota panitia teknis, unsur pemerintah, lembaga penelitian dan instansi terkait lainnya dengan memperhatikan:

1. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. PER.19/Men/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Pangan.
2. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke wilayah Republik Indonesia.
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
5. Keputusan Menteri Kelautan Perikanan Nomor 26/Kepmen-KP/2013 tentang Penetapan Jenis-Jenis Hama Penyakit Ikan Karantina (HPIK), Media Pembawa, Golongan dan Sebaranya.

Standar ini telah dilakukan jajak pendapat pada tanggal 30 Agustus 2014 sampai dengan 29 Oktober 2014 dengan hasil akhir RASNI.

Deteksi nervous necrosis virus (NNV) - Bagian 1: Metode *reverse transcription nested polymerase chain reaction* (PCR)

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan deteksi *nervous necrosis virus* (NNV) dengan metode *reverse transcription nested polymerase chain reaction* (PCR).

2 Istilah dan definisi

Untuk tujuan penggunaan dalam dokumen ini, istilah dan definisi berikut digunakan :

2.1

alikuot

pembagian menjadi beberapa ukuran yang lebih kecil agar memudahkan pemakaian dan mencegah dari kemungkinan kontaminasi

2.2

amplifikasi

proses penggandaan asam deoksiribonukleat (DNA) secara *in vitro* menggunakan enzim polimerase

2.3

annealing

proses penempelan primer pada DNA untai tunggal yang komplementer

2.4

denaturasi

proses pemisahan DNA untai ganda menjadi untai tunggal

2.5

ekstensi

proses sintesis DNA baru yang komplemen terhadap DNA target dengan bantuan enzim DNA polimerase

2.6

elektroforesis

proses pemisahan DNA hasil amplifikasi berdasarkan berat molekul dalam medan listrik

2.7

koktail

larutan yang berisi berbagai komponen untuk proses amplifikasi

2.8

nested PCR

suatu teknik PCR dengan metode analisis yang dilakukan dalam dua tahap menggunakan dua set primer

2.9

pelet

endapan yang terbentuk hasil sentrifugasi

2.10

primer

oligonukleotida dengan urutan basa spesifik yang digunakan sebagai awal sintesis DNA secara *in vitro*

2.11

template

sekuen DNA tertentu yang akan diamplifikasi

2.12

supernatan

cairan hasil sentrifugasi

3 Prinsip umum

Mengekstraksi RNA dari organ target/jaringan yang diduga terinfeksi NNV, dilanjutkan dengan proses transkripsi balik untuk mensintesis cDNA dan amplifikasi yang berlangsung dalam dua tahap (*nested*) secara konvensional.

4 Peralatan

- a) mesin PCR(*thermal cycler*);
- b) alat bedah;
- c) alat elektroforesis gel agarose;
- d) alat dokumentasi;
- e) *freezer* (-20°C atau yang lebih rendah);
- f) *laminar air flow cabinet*;
- g) mikropipet berbagai ukuran 0,1 µl – 1000 µl;
- h) *minimixer*;
- i) *refrigerated centrifuge* minimal 12 000 x g (12 000 rpm);
- j) *spindown centrifuge*;
- k) timbangan analitik;
- l) transiluminator UV.

5 Bahan

- a) etanol absolut p.a;
- b) *filtered microtip* berbagai ukuran 10 µl – 1 000 µl;
- c) kit komersial RT-PCR dan PCR;
- d) kit ekstraksi RNA komersial;
- e) kloroform (CHCl₃);
- f) kontrol positif NNV;
- g) larutan pembersih *RNase*;
- h) *marker DNA* (100 bp DNA ladder);
- i) *nuclease free water*;
- j) pewarna DNA;
- k) penggerus jaringan (*pellet pestle*);
- l) pewarna gel;
- m) *RNase inhibitor*;
- n) sarung tangan (*powder-free*);

- o) 2 set primer spesifik¹ (Thiery *et al.*, 1999)
 - F2 : 5'-CGTGTCTCAGTCATGTGTCGCT-3'
 - R3 : 5'-CGAGTCAACACGGGTGAAGA-3'
 - NF2 : 5'-GTTCCCTGTACAACGATTCC-3'
 - NR3 : 5'-GGATTTGACGGGGCTGCTCA-3'
- p) Pasangan primer spesifik antara F2 dan R3 serta NF2 dan NR3 tabung mikro ukuran 0,2 ml; 1,5 ml – 2 ml.

6 Prosedur

6.1 Persiapan contoh uji

- a) Telur dan larva (kurang dari 1 cm)
Contoh uji diambil utuh.
- b) Ikan ukuran sedang (ukuran 1 cm – 6 cm)
Contoh uji dapat diambil dari bagian kepala
- c) Ikan ukuran besar (lebih dari 6 cm)
Contoh uji dapat diambil dari organ mata dan otak baik segar maupun beku (-20 °C) atau yang sudah diawetkan dalam larutan preservatif RNA.

6.2 Ekstraksi RNA²

- a) masukkan contoh uji sebanyak 20 mg - 50 mg ke dalam tabung mikro 1,5 ml;
- b) tambahkan 500 µl larutan kit RNA komersial ke dalam tabung mikro kemudian gerus sampai halus lalu diamkan pada 25 °C – 30 °C selama 5 menit;
- c) tambahkan 100 µl kloroform untuk setiap 500 µl larutan kit RNA komersial yang digunakan;
- d) kocok tabung contoh uji dengan tangan selama 15 detik kemudian inkubasi contoh uji pada ruang selama 2 menit – 3 menit;
- e) sentrifugasi contoh uji pada 12 000 x g selama 15 menit pada 4 °C;
- f) pindahkan cairan lapisan paling atas ke dalam tabung mikro baru;
- g) tambahkan 250 µl isopropanol untuk setiap 500 µl kit RNA komersial yang digunakan kemudian diamkan pada 25 °C – 30 °C selama 10 menit;
- h) sentrifugasi pada 12 000 x g selama 10 menit pada 4 °C;
- i) buang supernatan, cuci pelet dengan 750 µl etanol 75%, sentrifugasi pada 7 500 xg selama 5 menit pada 4 °C;
- j) buang supernatan dan keringanginkan pelet RNA selama 5 menit – 10 menit;
- k) larutkan pelet RNA di dalam 20 µl - 50 µl *nuclease free water*;
- l) inkubasi larutan dengan menggunakan *heating block* atau *waterbath* pada 55 °C – 60 °C selama 10 menit -15 menit;
- m) simpan larutan RNA pada -20 °C apabila segera digunakan dan untuk penyimpanan lebih lama pada -80 °C dalam bentuk alikuot.

6.3 Transkripsi balik dan amplifikasi *nested*

6.3.1 Transkripsi balik dan amplifikasi tahap pertama

- a) setiap analisis NNV dengan PCR harus ada kontrol NNV positif dari contoh uji (dapat berasal dari contoh jaringan uji positif NNV) dan kontrol negatif atau *non template control*;

¹bisa menggunakan primer yang sudah diverifikasi dan divalidasi di laboratorium.

²bergantung pada jenis kit RNA komersial

- b) siapkan reaksi transkripsi balik dan amplifikasi PCR tahap pertama dengan komposisi sesuai Tabel 1:

Tabel 1 Komposisi bahan koktail untuk transkripsi balik dan amplifikasi tahap pertama

No	Reagen RT - PCR	Volume (µl)	Konsentrasi Akhir
1	Nuclease free water	14,725	-
2	5x PCR Buffer	5,00	1 x
3	MgCl ₂ 25 mM	1,50	1,5 mM
4	dNTP _{mix} (10 mM)	0,50	200 µM
5	Primer F2 (10 µM)	0,50	0,2µM
6	Primer R3 10 µM)	0,50	0,2 µM
7	DNA Taq Polymerase 5 U/µl	0,125	0,625 U
8	RNase inhibitor (40 U/µl)	0,05	2 U
9	AMV Reverse transcriptase (10 U/µl)	0,10	1 U
10	RNA Template	2,00	0,4 ng - 4 ng
Total		25	
CATATAN Komposisi koktail disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan dan sudah divalidasi			

- c) setelah semua bahan dicampur kecuali *template*, bagikan ke dalam tabung mikro 0,2 ml dengan volume masing-masing 23 µl;
d) tambahkan *template* atau contoh uji RNA, termasuk kontrol positif dan kontrol negatif (ddH₂O), pada masing-masing tabung mikro sebanyak 2 µl;
e) homogenkan dan masukkan tabung mikro kedalam mesin PCR (*thermocycler*);
f) operasionalkan amplifikasi dengan kondisi sesuai Tabel 2;

Tabel 2 Profil transkripsi balik dan amplifikasi tahap pertama

Proses	Suhu (°C)	Waktu	Siklus
Transkripsi balik	48	45 menit	-
Denaturasi awal	94	2 menit	-
Amplifikasi	95	40 detik	40
	55	40 detik	
	72	40 detik	
Ekstensi akhir	72	5 menit	-
Hold	4	sampai proses berikutnya	-
CATATAN Profil amplifikasi disesuaikan dengan bahan amplifikasi yang digunakan dan mesin PCR yang digunakan			

- g) setelah proses berakhir, matikan *thermocycler* dan keluarkan tabung mikro;
h) produk PCR siap dilanjutkan untuk amplifikasi tahap kedua (*nested*).

6.3.2 Nested PCR dan amplifikasi tahap kedua

- a) siapkan reaksi PCR dengan komposisi seperti pada Tabel 3 berikut :

Tabel 3 Komposisi bahan koktail untuk amplifikasi tahap kedua (*nested*)

No	Reagen RT-PCR	Volume (µl)
1	Master mix	12,5

No	Reagen RT-PCR	Volume (µl)
2	Primer NF2	1,0
3	Primer NR3	1,0
4	<i>Nuclease free water</i>	8,5
5	DNA template (produk PCR tahap pertama)	2
Total		25
CATATAN Komposisi koktail disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan dan sudah divalidasi		

- setelah semua bahan dicampur kecuali *template*, bagikan ke dalam tabung mikro 0,2 ml dengan volume masing-masing 23 µl.
- tambahkan *template* atau contoh uji DNA, termasuk kontrol positif dan kontrol negatif (ddH₂O), pada masing-masing tabung mikro sebanyak 2 µl.
- homogenkan dan masukkan tabung mikro kedalam mesin PCR (*thermocycler*).
- operasionalkan amplifikasi tahap kedua dengan kondisi seperti pada Tabel 4.

Tabel 4 Profil amplifikasi tahap kedua

Proses	Suhu (°C)	Waktu	Siklus
Denaturasi awal	94	2 menit	-
Amplifikasi	94	40 detik	40
	50	40 detik	
	72	40 detik	
Ekstensi akhir	72	10 menit	-
<i>Hold</i>	4	sampai proses berikutnya	-
CATATAN Profil amplifikasi disesuaikan dengan bahan amplifikasi yang digunakan dan mesin PCR yang digunakan			

- setelah proses berakhir, matikan *thermocycler* dan keluarkan tabung mikro kemudian lanjutkan dengan elektroforesis.

6.4 Elektroforesis

6.4.1 Persiapan

Pembuatan larutan bufer elektroforesis dan gel dapat dilihat pada Lampiran A.

6.4.2 Prosedur

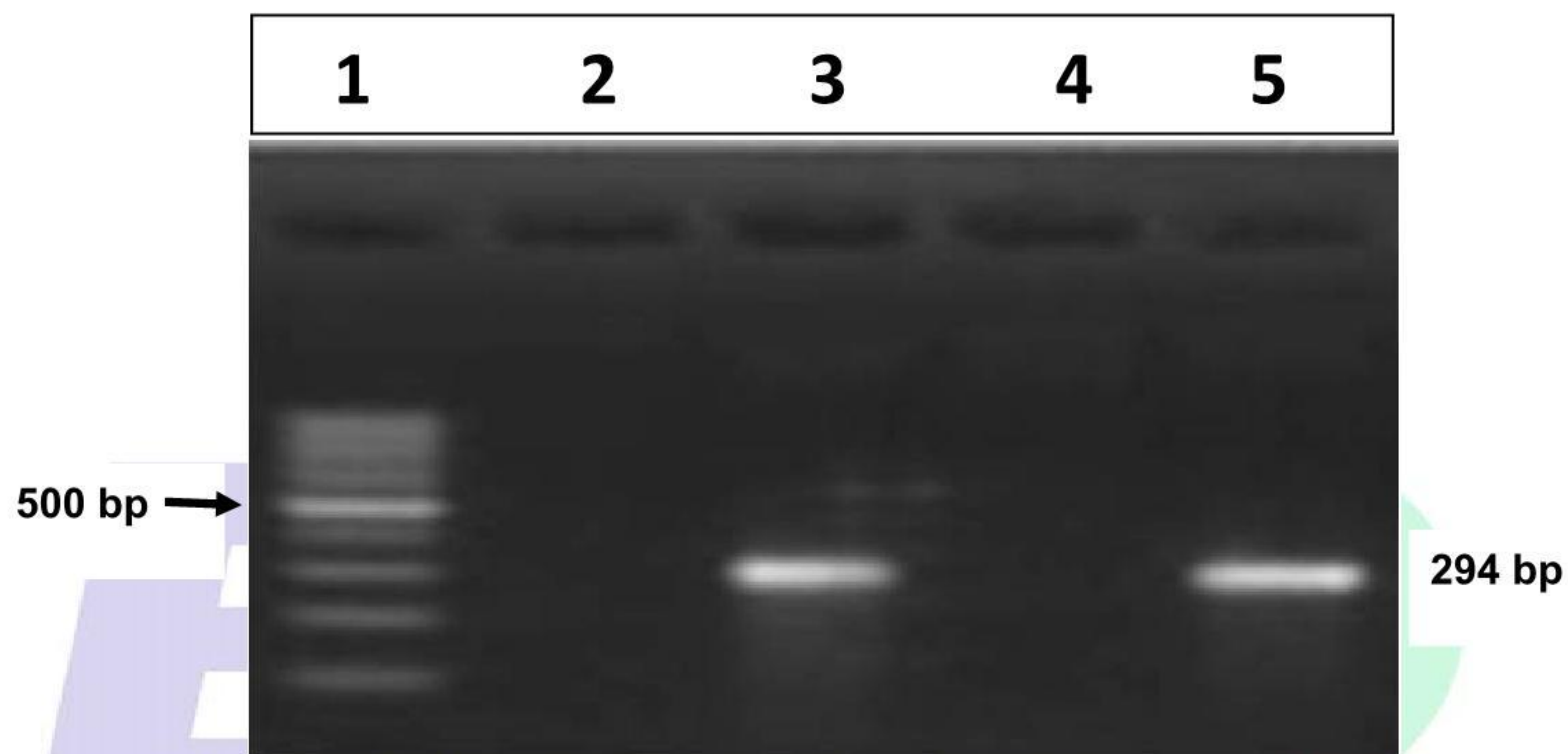
- letakkan gel yang sudah dicetak di atas *chamber* elektroforesis;
- isi *chamber* dengan larutan bufer elektroforesis 1 x sampai gel terendam;
- siapkan tabung mikro yang sudah di amplifikasi lalu tambahkan 5 µl 6x *loading dye* pada masing-masing tabung mikro, campur hingga homogen;
- masukkan 5 µl marker atau penanda DNA (100 bpDNA *ladder*);
- masukkan produk PCR yang sudah tercampur dengan *loading dye* dengan mikropipet ke dalam sumuran gel sebanyak 8 µl;
- pasang tutup elektroforesis dan alirkan listrik dengan voltase diatur 100 V - 150 V selama 30 menit atau sampai pewarna biru-bromofenol mencapai 2/3 bagian panjang gel agarose.

7 Pengamatan hasil dan dokumentasi

- setelah selesai proses elektroforesis, gel diangkat dari *chamber*;
- rendam gel dalam larutan zat pewarna DNA 0,05% selama 10 menit. Gunakan sarung tangan;
- rendam gel dengan akuades/ air mengalir selama selama 10 menit;
- amati dan dokumentasikan.

8 Intepretasi hasil

- hasil positif NNV apabila terlihat pita DNA (*band*) dengan ukuran 294 bp;
- hasil negatif NNV apabila tidak terlihat pita DNA (*band*).



Gambar 1 – Contoh elektroferogram produk PCR nested

Keterangan gambar :

Lane 1 : marker 100 bp

Lane 2 : kontrol negatif

Lane 3 : kontrol positif

Lane 4 : contoh uji negatif NNV

Lane 5 : contoh ujipositif NNV

Produk PCR positif NNV akan menghasilkan pita DNA 294 bp

Produk PCR negatif NNV tidak menghasilkan pita apapun

9 Jaminan Mutu

- hasil ekstraksi RNA mempunyai rasio A_{260}/A_{280} berkisar 1,8 – 2,0.
- proses amplifikasi dijamin kualitasnya dengan menyertakan satu kontrol positif dan satu kontrol negatif dengan menunjukkan hasil yang konsisten.

10 Keamanan dan keselamatan kerja

- gunakan jas laboratorium, sarung tangan dan penutup mulut. dan jika berambut panjang harus diikat dengan rapi selama bekerja di laboratorium.

- b) dilarang merokok, makan (termasuk mengunyah permen karet) atau minum di ruangan laboratorium.
- c) jangan memasukkan pensil, pulpen, kertas label dan barang lainnya kedalam mulut saat bekerja di laboratorium. benda-benda tersebut juga tidak boleh dibawa keluar ruangan laboratorium untuk menghindari kontaminasi.
- d) dilarang memipet menggunakan mulut, dan hindarkan aerosol saat memindahkan cairan.
- e) bersihkan meja kerja dengan disinfektan sebelum dan sesudah bekerja.
- f) tempatkan dalam wadah khusus gel dan semua peralatan sekali pakai seperti kertas tisu, sarung tangan dan material padat lainnya yang mengandung pewarna DNA untuk kemudian diserahkan kepada pihak ketiga secara periodik untuk dimusnahkan.
- g) tempatkan gel atau cairan yang mengandung pewarna DNA ke dalam wadah untuk dimusnahkan.
- h) jika terjadi tumpahan pewarna DNA, jika sedikit serap dengan kertas tisu, jika banyak serap dengan *attapulgit absorption* kemudian gosok dengan tisu tebal yang dibasahi dengan campuran 4,2 gram *sodium nitrite* dalam 300 ml air dan tambahkan 20 ml *hyphosphorous acid* (50%). Aduk rata agar tercampur (pH 1,8) kemudian keringkan.
- i) buanglah material tajam (jarum, *scalpel*, slide pecah, tip, dll) kedalam wadah pembuangan khusus material tajam untuk dimusnahkan.
- j) cuci tangan dengan air dan sabun sebelum dan setelah selesai bekerja.
- k) bekerjalah dengan berhati-hati dan tidak terburu-buru.



Lampiran A
(informatif)
Pembuatan larutan

A.1 Larutan bufer elektroforesis 1 x

A.1.1 TAE

Cara membuat :

Tambahkan 1 ml larutan TAE 40 x kedalam 39 ml akuades.

A.1.2 TBE

Cara membuat :

Tambahkan 1 ml larutan TBE 40 x kedalam 39 ml akuades

A.2 Pembuatan agarose gel

Buat gel *agarose* 2% dengan melarutkan 2 gram *agarose* dalam 100 ml larutan 1 kali bufer **elektroforesis**, kemudian dididihkan sehingga larutan menjadi bening. Setelah suhunya mencapai sekitar 60 °C, tuang *agarose* pada cetakan yang telah dipasang dengan sisir dan biarkan sampai dingin.

A.3 Pembuatan pewarna DNA (10 mg/ml)

- a) tambahkan 1 g pewarna DNA ke dalam 100 ml akuades.
- b) aduk dengan *magnetic stirrer* beberapa jam sampai pewarna DNA terlarut.
- c) bungkus tabung dengan aluminium *foil* atau pindahkan ke dalam botol gelap dan simpan pada suhu kamar.
- d) untuk membuat larutan pewarnaan (siap pakai), ambil 10 µl 1% pewarna DNA kemudian diencerkan ke dalam 100 ml akuades, campurkan, larutan siap digunakan

A.4 Pembuatan alkohol 75%

- a) tuangkan alkohol absolut sebanyak 75 ml ke dalam gelas ukur.
- b) tambahkan akuades sampai dengan volume 100 ml.

Lampiran B
(Informatif)
Pilihan komposisi bahan koktail untuk tahapan amplifikasi

B.1 Bahan koktail PCR dengan metoda *PCR beads*

Reagent	25 μ l PCR beads	Konsentrasi akhir
Akuades steril	22,0 μ l	-
Primers F2 (10 μ M)	0,5 μ l	0,5 μ M
Primers R3 (10 μ M)	0,5 μ l	0,5 μ M
Template	2,0 μ l	-

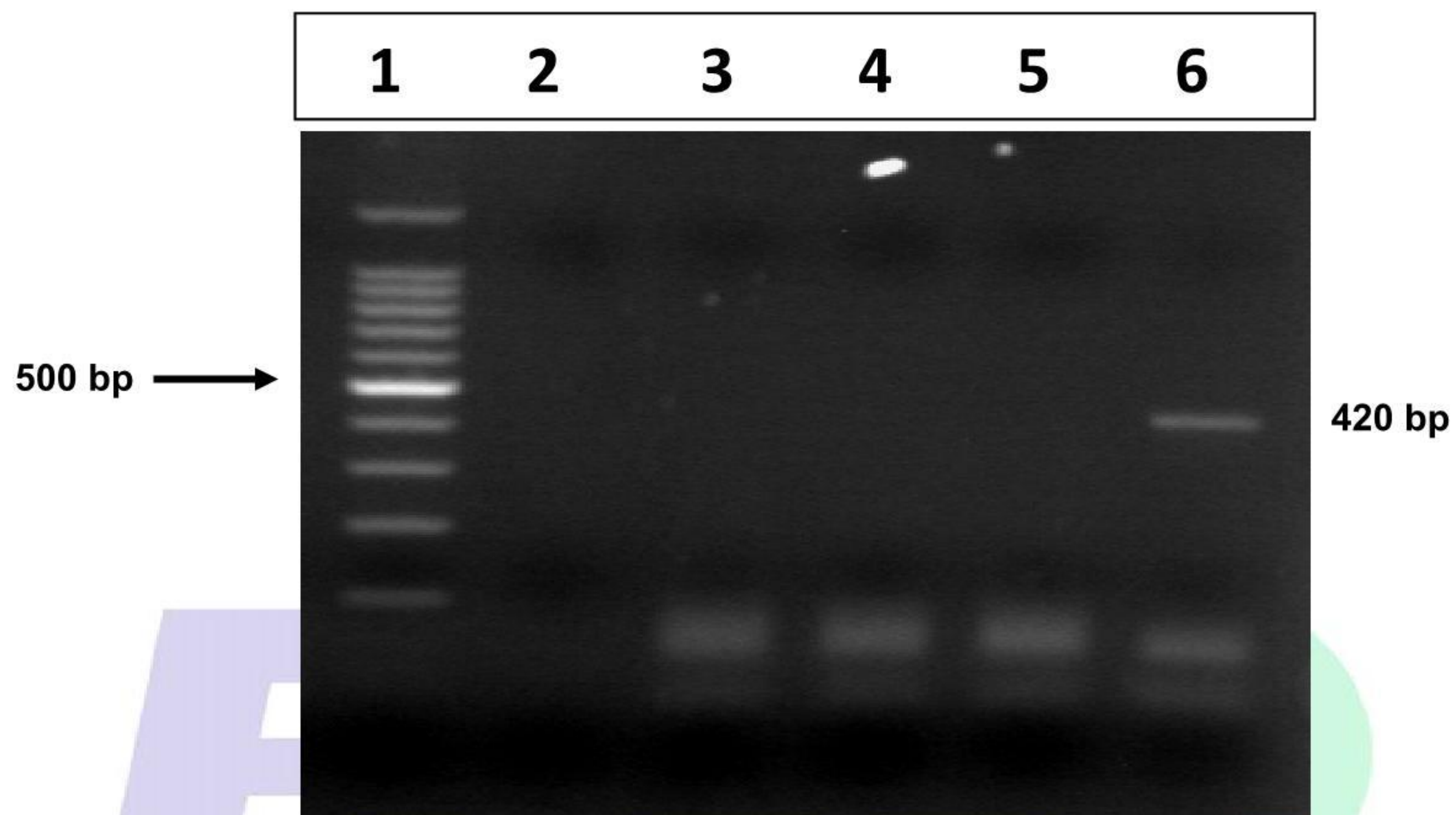
B.2 Bahan koktail *nested-PCR* dengan komersial *mastermix*

Komposisi	Volume (μ l)	Konsentrasi akhir
akuabides	9,5	
2 x <i>mastermix</i>	12,5	1x
primer F2 (10 μ M)	0,5	200 nM
primer R3(10 μ M)	0,5	200 nM
DNA <i>template</i>	2,0	10 ng -100 ng

Lampiran C (Informatif)

Interpretasi hasil untuk transkripsi balik dan amplifikasi tahap pertama

- Hasil positif NNV apabila terlihat pita DNA (*band*) dengan ukuran 420 bp.
- Hasil negatif NNV apabila tidak terlihat pita DNA (*band*), perlu dikonfirmasi dengan PCR tahap kedua.



Keterangan gambar :

- | | |
|--------|--------------------------|
| Lane 1 | : marker 100 bp |
| Lane 2 | : kontrol negatif |
| Lane 3 | : contoh uji negatif NNV |
| Lane 4 | : contoh uji negatif NNV |
| Lane 5 | : contoh uji negatif NNV |
| Lane 6 | : kontrol positif |

Bibliografi

- Hummon, A. B., Lim S. R., Difilippantonio, M. J., Ried, T. 2007. Isolation and solubilization of proteins after TRIzol® extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *BioTechniques* 42, 467-472
- Koesharyani, I dan H. Novita. 2006. Diagnosa “Nested reverse trancriptase – PCR” untuk “Viral Nervous Necrosis” pada benih ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis*. *Jurnal Riset Akuakultur* 1 (3) : 381 – 385.
- Office des Internationaldes Epizooties (OIE). 2012. *Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals*
- Thiery, R., Raimond, J.C., Castric, J. 1999b. Natural outbreak of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*: study by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Virus Res.* (63): 11–17

